"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР
А.И. Заиченко
"12" апреля 1986 г.
№ 3247-85

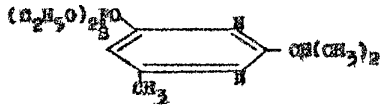
# ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БАЗУДИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ ЭНЗИМНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

( Дополнение к методическим указаниям по определению базудина в воде, почве и растительном материале тонкослойной и газожидкостной хроматографией №1916-78)

1. Краткая характеристика препарата

Базудин (0,0-диэтил-О-(2-изопропил-4-метил-6-пиримидил)-тиофосфат - диазинон

Структурная формула



$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$
М.м. 304,4

2. Методика определения базудина

Метод основан на экстракции препарата из исследуемой пробы органическим растворителем, очистке экстракта и определении методом хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением после активации препарата на пластинке в парах брома. Базудин, способный к угнетению холинэстеразы печени крупного рогатого скота, проявляется в виде пятен белого цвета на голубом фоне.

gost.e-ecolog.ru

Количественное определение производят путем сравнения пятен проб и стандарта.

2.I.I. Метрологическая характеристика метода

Минимально детектируемое количество I-5 нг или 0,00I-0,005 мкг

Нижний предел определения 0,05 мг/кг

| | Среднее значение определения, % | Стандартное отклонение, % |
|---|---|---|
| для астрагала шерстисто-цветкового | 93 | 2,5 |
| алтея лекарственного | 84 | 7,8 |
| мака масличного | 91 | 3,3 |
| ревеня тангутского | 80 | II,3 |
| ноготков лекарственных | 90 | 2,6 |
| плодов шиповника | 89 | 3,I |

| | Относительное стандартное отклонение, % | Доверительный интервал среднего при n=5 и p=0,95 |
|---|---|---|
| для астрагала шерстисто-цветкового | I,I | 3,0 |
| алтея лекарственного | 3,4 | 8,0 |
| мака масличного | I,5 | 4,I |
| ревеня тангутского | 5,I | I4,I |
| ноготков лекарственных | I,3 | 3,6 |
| плодов шиповника | I,4 | 3,8 |

2.2. Реактивы и растворы

Бензол х.д.а., ГОСТ 5955-75.

Этиловый спирт, ректификат, ТУ 6-09-I7-I0-77.

Бром, ч., ГОСТ 4I09-79.

Борная кислота, х.ч., ГОСТ 9656-75.

Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ 6-09-07-II56-78.

Уксусная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80.

Ортофосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80.

Гексан х.ч., ТУ 6-09-3375-78

Диметилформамид, х.ч., ГОСТ 20258-74

Калий железосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4206-75 - 1,6 % водный раствор

Калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-65 - 2%-ный водный раствор

Активированный уголь марки ОУ-А

Буферный раствор pH 8,69 - готовят смесь ортофосфорной ( 2,1 мл), уксусной ( 2,3 мл) и борной ( 2,47 г) кислот и доводят дистиллированной водой до 1 л. Для получения буфера с pH 8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н раствора едкого натра, который готовят растворением 0,8 г NaOH в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл.

Ферментный препарат получают из печени крупного рогатого скота (свежую, однократно замороженную и сохраняемую в дальнейшем в холодильнике печень можно использовать в течение 6 месяцев). Для приготовления ферментного раствора 1 г печени растирают в ступке с 9 мл буферного раствора, фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют этот раствор для опрыскивания пластинок. Применяют свежеприготовленный раствор.

Основной стандартный раствор базудина "А" - 100 мкг/мл, рабочий стандартный раствор "Б" - 1 мкг/мл - готовят разбавлением основного раствора "А" ( 1 мл раствора "А" доводят в мерной колбе до 100 мл ацетоном).

2.2.1. Проявляющий реагент: 10 мг индоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл дистиллированной воды, 2 мл раствора железосинеродистого калия и 2 мл железистосинеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят перед опрыскиванием.

2.2.2. Лекарственное растительное сырье

Трава астрагала шерстистоцветкового, ФС 42-533-72

Корень алтея неочищенный, ФС 42-812-73

Мак масличный, промышленное сырье, ГОСТ 6517-76

Корень ревеня ФС 42-1910-82

Цветки ноготков лекарственных, ФС 42-1391-80

Плоды шиповника, ГОСТ 1994-76, продлен до 01.07.87 г.

Трава алтея лекарственного

2.3. Приборы и посуда

Компрессорная установка УК-40/260, ТУ 64-1-2749-73 ( для равномерного мелкодисперстного опрыскивания пластинок)

Термостат СШ-36

Аппарат для встряхивания марки АВУ-1, ТУ 64-1-24-51-72

Эксикатор, ГОСТ 6372-73

Ступка керамическая d= 10 см, ГОСТ 9147-74

Камера для хроматографирования, ГОСТ 10565-63

Стеклянные пластинки 9×12 см или хроматографические пластинки "Силуфол"

Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 19391-81

Колбы конические плоскодонные на 250-500 мл, ГОСТ 10394-72

Колбы круглодонные на 250 мл со шлифом, ГОСТ 10394-72

Воронки делительные на 250-500 мл, ГОСТ 8613-76

Холодильник бытовой

Колбы мерные на 100 мл, ГОСТ 1770-74

Пробирки мерные на шлифах на 5-10 мл, ГОСТ 1770-74

Пипетки на 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, ГОСТ 1770-74

Микрошприц на 10 мкл, МШ-10, ТУ 5К-2.833.024

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Пластинки хроматографические

Стандартные хроматографические пластинки "Силуфол".

Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля КСК, сорби-

ленным гипсом.+

2.4.2. Отбор проб

Лекарственное растительное сырье измельчают и отбирают методом квартования среднюю пробу по 10,0 г.

2.5. Проведение определения

Из лекарственного растительного сырья, представленного травой и цветками, базудин экстрагируют 150 мл 50%-ного водного ацетона, из корней алтея и семян мака масличного - 100 мл ацетона, из корней ревеня и плодов шиповника - 100 мл гексана.

Из всех проб экстракцию проводят дважды на аппарате для встряхивания в течение одного часа.

Трава астрагала шерстистоцветкового и алтея лекарственного. Водно-ацетоновые экстракты объединяют, отфильтровывают в делительные воронки и подвергают очистке. С этой целью проводят реэкстракцию базудина гексаном по 50 мл трижды. Объединенные гексановые фракции сушат безводным сернокислым натрием, добавляют 2-3 г активированного угля марки ОУ-А, перемешивают и через 30 минут отфильтровывают в круглодонные колбы. Концентрируют экстракты под вакуумом при температуре 40°С до объема 0,5 мл, а затем на воздухе досуха. Остаток в колбе растворяют в ацетоне и количественно переносят в мерную пробирку с притертой пробкой. Общий объем экстракта в пробирке доводят до 10,0 мл. Закрывают пробкой и хорошо перемешивают.

Ноготки лекарственные(цветки). Для проб ноготков проводят дополнительную очистку. Для этого сухой остаток после удаления гексана растворяют в 5 мл этилового спирта, добавляют равное количество

---

+ Приготовление хроматографических пластинок производят в соответствии с инструкцией, изложенной в кн. М.А.Клисенко, Т.А.Лебедева, З.Ф.Юркова, "Химический анализ микроколичеств ядохимикатов", М., изд. "Медицина", 1972, с.293.

3%-ого раствора хлористого аммония и помещают в морозильную камеру на I час. Одновременно ставят для охлаждения смесь этилового спирта с 3%-ным раствором хлористого аммония в соотношении I:I. Раствор отфильтровывают в делительную воронку, промывают охлажденной смесью 2 раза по I0 мл и извлекают базудин из водно-спиртовой смеси 3 раза по 40 мл гексана. Гексановый экстракт сушат б/в сульфатом натрия, концентрируют и далее поступают как описано выше.

Алтей лекарственный (корни). К объединенным ацетоновым экстрактам добавляют равное количество дистиллированной воды, перемешивают и проводят реэкстракцию базудина гексаном как указано выше для травы алтея.

Мак масличный ( немолотые семена). Ацетоновые вытяжки из немолотых семян мака масличного как правило очистки не требуют. Их концентрируют и доводят объем общего экстракта в мерной пробирке с притертой пробкой до I0,0 мл.

Ревень тангутский (корни), шиповник (плоды) . Гексановые экстракты концентрируют до объема I0,0 мл переносят в делительную воронку, приливают 50 мл диметилформамида, насыщенного гексаном и взбалтывают 2 мин. Гексановый слой отбрасывают. В большую делительную воронку переносят диметилформамидный экстракт , приливают 250 мл воды, I5 мл насыщенного раствора хлористого натрия ,перемешивают и извлекают базудин н-гексаном три раза по 50 мл. Объединенные гексановые экстракты сушат б/в сернокислым натрием, отгоняют растворитель и далее поступают как описано выше.

2.5.2. Хроматографирование в тонком слое с энзимным проявлением

С целью уменьшения краевого эффекта хроматографические пластинки с силикагелем КСК или "Силуфол" предварительно разделяют на вертикальные полосы. Аликвотную часть экстракта пробы (I0 мкл) и стандартного раствора базудина (2-5 нг) наносят при помощи микрошприца на плас-

тинки.

Развитие хроматограммы производят в смеси н-гексана с ацетоном в объемном соотношении 4:I для проб астрагала, ноготков, алтея и мака масличного, 9:I - для шиповника. Для хроматографирования экстрактов ревеня предложены сдедующие системы подвижных растворителей: I - бензол, II - ацетон-гексан (I:4). Когда фронт растворителя поднимется на I0 см, пластинку вынимают из камеры и дают растворителю испариться. Для активации базудина в парах брома пластинку помещают на I минуту в эксикатор, насыщенный парами брома. Силуфольные пластинки активируют в течение I0 сек.

После удаления избытка брома с пластинки ( 60 мин) ее обрабатывают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в течение 60 мин в насыщенном водными парами термостате при температуре 38°С ( для увлажнения ставят чашку Петри с водой).

После инкубации пластинки опрыскивают проявляющим реагентом и помещают в термостат при температуре 38°С. Базудин проявляется в течение I0 мин в виде белых пятен на голубом фоне.

$R_f$ базудина на пластинках с силикагелем КСК и "Силуфол" в системе ацетон-гексан (I:4) составляет соответственно 0,50 и 0,60, в системе ацетон-гексан (I:9) - 0,43 и 0,55 и в системе I- бензол, II--ацетон-гексан(I:4) - 0,50 и 0,70.

2.5.3. Обработка результатов анализа

Содержание базудина определяют путем сравнения площади пятен пробы и стандарта. Пропорциональная зависимость площади пятна от концентрации соблюдается в пределах 5 -50 мг. (мг/кг)

Расчет содержания препарата в анализируемом объекте производят по формуле

$$X = \frac{A \cdot S_2 \cdot V \cdot 1000}{S_1 \cdot V_1 \cdot P}$$ ; где ;

A - содержание препарата в стандарте, мкг

$S_1$ - площадь пятна стандарта, $мм^2$

$S_2$ - площадь пятна пробы, $мм^2$

$V_1$ - объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл

V - общий объем экстракта, мл

P - масса пробы, взятой на анализ, г

3. Требования безопасности

Соблюдаются требования безопасности обычно рекомендуемые для работы с химическими реактивами.

4. Настоящие методические указания разработаны:

Г.И.Крамаренко, С.С.Горлачевой (г.Лубны Полтавской обл., Украинская зональная опытная станция лекарственных растений ВИЛР), М.В.Письменная ( г.Киев, ВНИИГИНТОКС)

5. Апробированы:

В Украинском НИИ защиты растений (г.Киев), ВНИИ лекарственных растений (г.Москва)

gost.e-ecolog.ru